

cited in the European Search
Report of EP 0 731 345.0
Your Ref.: 57314 EP 005 (10/027,222)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 31 670 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/00
C 07 H 1/06
C 12 Q 1/68

②① Aktenzeichen: 197 31 670.0
②② Anmeldetag: 23. 7. 97
②③ Offenlegungstag: 28. 1. 99

DE 197 31 670 A 1

⑦① Anmelder:

Waschk, Dorothea, Dr.rer.nat., 65549 Limburg, DE;
Zeuzem, Stefan, Priv.-Doz. Dr.med, 63303 Dreieich,
DE; Roth, W. Kurt, Priv.-Doz. Dr.med., 65185
Wiesbaden, DE

⑦④ Vertreter:

Tiedtke, Bühling, Kinne & Partner, 80336 München

⑦② Erfinder:

gleich Anmelder

⑤⑧ Entgegenhaltungen:

DE 1 96 38 362 C1
DE 41 39 664 A1

Pharmazeutische Stoffliste S.242-S.243, Colesty-
ramin;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben

⑤⑦ Es wird ein Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben beschrieben, wobei das Verfahren den Schritt umfaßt, daß die Nukleinsäure-haltige Probe zur Abtrennung von Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Analyse-reaktion mit einem mit quartären Ammoniumgruppen modifizierten Copolymeren aus Vinyl- und Divinyl-Monomeren umgesetzt wird.

DE 197 31 670 A 1

DE 197 31 670 A 1

1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren (DNA, RNA) aus biologischen Proben, wobei zur Reinigung der Nukleinsäure Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-, insbesondere DNA-Nachweisreaktion abgetrennt werden.

Die Reinigung von Nukleinsäuren spielt eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie. Vor allem die DNA dient als Ausgangsmaterial für genetische Analysen in der labor-diagnostischen Forschung und im routinemäßigen Einsatz.

Die Isolierung von Nukleinsäuren wie DNA und RNA aus biologischen Proben, insbesondere aus Proben des menschlichen Körpers, wie zum Beispiel Blut, Körpersekreten, Gewebeproben, Urin, Stuhl u. dergl., zum nachfolgenden Einsatz in genetische Analysen kommt eine besondere Bedeutung zu, insbesondere im Hinblick auf ein Screening in der Tumordiagnostik sowie zur Diagnose infektiöser Agentien wie Viren oder Bakterien.

So ist zum Beispiel die Analyse der DNA, die aus abgeschilferten Darmepithelzellen von Stuhlproben stammt, von besonderem Interesse zur Diagnostik kolorektaler Tumoren. Von großem Interesse ist auch eine Isolierung der Nukleinsäure aus dem Vollblut, um die isolierte Nukleinsäure einer genetischen Analyse zugänglich zu machen.

Insbesondere soll die dabei anfallende DNA in hoher Reinheit vorliegen und direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden können.

Eine Nukleinsäure-Diagnostik unter Einsatz von DNA-Amplifikationsansätzen, insbesondere der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, im Folgenden PCR abgekürzt) (s. Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988), *Science* 239: 487-491), eröffnet vielfältige Ansätze zu einer spezifischen und zugleich sensitiven DNA-Diagnostik, z. B. von Tumoren im Frühstadium, die nicht belastend und für ein Screening gut geeignet sind. Aufgrund der insgesamt geringen DNA-Menge, die aus einer definierten Stuhlmenge isoliert werden kann, scheinen DNA-Amplifikationsansätze wie die PCR-Technik eine geeignete Methode zur Vervielfältigung der interessierenden DNA zu sein.

Hauptschwierigkeiten stellen jedoch Inhibitoren dar, die bei der Anwendung gängiger Extraktionsmethoden gemeinsam mit der DNA der biologischen Probe isoliert werden, und die die in den DNA-Amplifikationsansätzen einzusetzenden Enzyme inhibieren. So hat sich herausgestellt, daß die für die PCR erforderliche DNA-Polymerase inhibiert wird. Insbesondere Stuhlproben und Vollserum sind kritische biologische Ausgangsproben, da sie mit relativ großen Mengen an Inhibitoren behaftet sind. Die durch die Reinigung und Isolierung anfallende Nukleinsäure (DNA, RNA) soll in hoher Reinheit vorliegen und direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden können. Die Inhibitoren müssen daher effizient und selektiv abgetrennt werden.

Üblicherweise wird die DNA aus Zellen isoliert. Dabei werden Zellen beispielsweise unter stark denaturierenden und gegebenenfalls reduzierenden Bedingungen aufgeschlossen. Weit verbreitet ist der Aufschluß der Zellen mit denaturierenden Substanzen, z. B. Detergenzien, und die Verwendung von bestimmten Enzymen zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren. So wird beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS) als denaturierendes Agens verwendet, Proteinase K zum Abbau von Proteinen und RNase A zur Degradation von Ribonukleinsäuren (RNA). Zur vollständigen Denaturierung von Proteinen wird die DNA-hal-

2

tige Lösung mit dem organischen Lösungsmittel Phenol extrahiert. Durch die anschließende Ethanolpräzipitation erfolgt die Konzentrierung der DNA und gleichzeitig die Entfernung verbleibender Phenolreste aus der deproteinierten, wäßrigen Lösung. (Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, S. (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor).

Die mit einem solchen Verfahren gewonnene DNA, z. B. aus abgeschilferten Darmepithelzellen von Stuhlproben, eignet sich nur begrenzt für den Einsatz in die sich anschließenden Folgereaktionen, insbesondere enzymatische Amplifikationsreaktionen, wie die PCR. So belegen jüngere Daten, daß sich nur in 103 Fällen von insgesamt 230 extrahierten Stuhlproben (Effizienz von 44,7%) die DNA mittels PCR amplifizieren läßt (Villa, E., Dugani, A., Rebecchi, A.M., Vignoli, A., Grottola, A., Buttafoco, P., Losi, L., Perini, M., Trande, P., Merighi, A., Lerose, R. and Manenti, F. (1996), *Gastroenterology*: 110: 1346-1353).

Deuter et al. veröffentlichten 1995 eine Methode zur Isolierung von DNA aus Stuhlproben, die das beschriebene Verfahren zeitlich verkürzt und vereinfacht (Deuter, R., Pietsch, R., Hertel, S. and Müller, O. (1995), *Nucl. Acids Res.*, 23: 3800-3801). Die sich im Stuhl befindlichen abgeschilferten Darmepithelzellen werden lysiert und mit einem Adsorbens (Kartoffelmehl oder Kartoffelstärke oder Rinderserumalbumin) enthaltenden Puffer extrahiert. Zum Abbau von Proteinen und nukleinsäurespaltenden Enzymen wird die DNA-haltige Lösung mit der Proteinase K inkubiert. Die zeitliche Verkürzung dieses Verfahrens beruht darauf, daß die Phenolextraktion und anschließende Ethanolfällung durch die Verwendung von Zentrifugationssäulen (QIAamp spin columns, QIAGEN GmbH) ersetzt werden. Während die DNA reversibel an eine Silikamembran in der Säule bindet, werden störende Verbindungen durch die Verwendung eines geeigneten Waschpuffers infolge der Wirkung von Zentrifugalkräften durch die Membran gepreßt und somit abgereinigt. Durch Zugabe eines geeigneten Puffers wird die gereinigte DNA infolge eines Zentrifugations-schrittes von der Säule eluiert. Da sich jedoch Flüssigkeiten nicht vollständig aus solchen Membranen entfernen lassen, hat man immer mit einem Verlust der DNA-Ausbeute zu rechnen. Die nach diesem Verfahren gewonnene DNA liegt nicht in ausreichend guter Qualität ($A_{260}/A_{280} = 1,5$) und Menge (2 µg DNA/200 mg Stuhlprobe) vor. Folgereaktionen, insbesondere die PCR, erfordern eine hohe und reproduzierbare Ausbeute der DNA-Rohpräparate unter gleichzeitiger intensiver Abreinigung störender Inhibitoren.

Die Amplifikation eines definierten Gens/Genabschnitts der nach der von Deuter et al. beschriebenen Methode präparierten DNA mittels einer einfachen PCR zeigt eine Effizienz von 16%. Auch durch eine nachfolgende Phenolextraktion dieser DNA läßt sich die Amplifikationseffizienz nur von 16 auf 40% erhöhen. Lediglich die Anwendung einer verschachtelten ("nested") PCR, die sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit und Sensitivität, bei gleichzeitiger Ausdünnung potentieller Inhibitoren, auszeichnet (Newton, C.R. and Graham, A. (1994), PCR, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland), erzielt eine erhöhte Amplifikationsausbeute von 66%.

Es ist wünschenswert, die DNA in ausreichender Menge und in reproduzierbar guter Qualität zu isolieren, so daß definierte Gene/Genabschnitte in einer einfachen, d. h. nicht verschachtelten, PCR vervielfältigt werden können. Die Durchführung einer verschachtelten PCR zeigt sich für bestimmte Anwendungen (z. B. routinemäßige Untersuchungen im diagnostischen Labor) nachteilig, da hier die Rate der falsch Positiven durch Produktkontaminationen erhöht ist.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht so-

DE 197 31 670 A 1

3

mit in der Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Isolierung von Nukleinsäuren (DNA, aber auch RNA) aus ungereinigten biologischen Proben wie Vollblut oder Stuhlproben; dabei soll die Nukleinsäure in ausreichender Menge vorliegen und nicht mit Inhibitoren verunreinigt sein, so daß sie direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden kann.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Isolierung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben, wobei das Verfahren den Schritt umfaßt, daß die Nukleinsäure-haltige Probe zur Abtrennung von Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Analyse mit einem mit quartären Ammoniumgruppen modifizierten Copolymeren aus Vinyl- und Divinyl-Monomeren umgesetzt wird.

Als Nukleinsäurearten kommen sowohl DNA als auch RNA in Frage. Aufgrund der größeren Bedeutung, vor allem aber weil Nukleinsäure-Amplifikationsreaktionen in der Regel auf DNA-Proben aufgebaut sind (vgl. die PCR), wird die Erfindung im Folgenden stellvertretend zur Isolierung von DNA beschrieben.

Wesentliches Merkmal der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung eines mit quartären Ammoniumgruppen modifizierten Copolymeren aus Vinyl- und Divinyl-Monomeren, das die selektive Abreinigung der Inhibitoren ermöglicht, zur Reinigung und Isolierung der DNA. Das spezielle Copolymer dient dabei als Anionenaustauscher-Harz, welches überraschenderweise die stofflich bisher nicht charakterisierten Inhibitoren stark bindet, während die DNA wesentlich schwächer gebunden wird und somit eine effiziente Trennung von Inhibitoren und DNA erzielt wird. Die das Copolymer aufbauenden Vinyl- und Divinyl-Monomeren schließen auch substituierte Vinyl- und Divinyl-Monomere ein. Des weiteren können die aus dem Copolymeren gebildeten Harze weitere Additive enthalten.

Als Copolymer ist ein Copolymer aus aromatischen Vinyl- und Divinyl-Monomeren, beispielsweise Vinylbenzol und Divinylbenzol, besonders gut geeignet, wobei das Copolymer auf an sich bekannte Weise durch quartäre Ammoniumgruppen modifiziert ist. Zur Ladungsabsättigung enthält das Copolymer zudem geeignete Salzpartner, wie zum Beispiel Chlorid. Ausgezeichnete Resultate hat der Einsatz von Colestyramin geliefert. Colestyramin ist der internationale Freiname für das Plasma-Cholesterinspiegel senkende Copolymer von Styrol (Vinylbenzol) und etwa 2% Divinylbenzol mit in die Netzstruktur eingefügten quartären Ammoniumgruppen. Das Colestyramin-Granulat ist auch bekannt als ein stark hydrophiles, wasserlösliches, basisches Anionenaustauscherharz zur Bindung von Gallensäuren bei Gallensäurenverlustsyndromen und zur Behandlung von Hypercholesterinämie. Der Lipidsenker Colestyramin wird von der Firma STADA Pharm vertrieben.

Es hat sich gezeigt, daß bereits ein einmaliges Umsetzen des erfindungsgemäß eingesetzten Anionenaustauscher-Harzes eine ausreichende selektive Abreinigung der Inhibitoren ermöglichte. Die eingesetzte Menge des speziellen Copolymeren beträgt vorzugsweise 10 Gew.-% und weniger, bezogen auf das Gesamtgewicht der behandelten Probe. Oberhalb dieser Menge besteht die Tendenz, daß nicht nur die Inhibitoren, sondern auch die gewünschte DNA in zunehmendem Maße an das Harz gebunden wird.

Ein weiteres, überraschendes Ergebnis ergab sich aus einem Vergleich zu anderen, basischen Anionenaustauscher-Harzen, wie einem FPLC-MonoQ™-System, einem Diethylaminoethyl-Harz (DEAE-Sephacel™; DE-52) oder dem Qiagen™-Silikamembranaustauscher. Obwohl es sich um das gleiche Prinzip eines Anionenaustausches handelt, bindet das ammoniumhaltige Copolymer aus Vinyl- und Divi-

4

nyl-Monomeren die Inhibitoren aus dem biologischen Ausgangsmaterial selektiver und effektiver, so daß die nachfolgenden Nukleinsäure-Analysereaktionen bereits bei Anwendung einer einfachen PCR sehr hohe Amplifikationsraten erbringen. Wesentlich bessere Resultate ergeben sich bereits beim Einsatz einer geringeren Menge an Anionenaustauscher-Harz, und ferner sind eine geringere Anzahl an Extraktionsschritten erforderlich; in der Regel reicht ein Inkubationsschritt aus.

Die mit der Erfindung erzielbare, selektive Abtrennung der Inhibitoren wird auch bei ungereinigten Ausgangsproben erreicht.

So hat sich das erfindungsgemäße Verfahren als besonders wirksam erwiesen bei bisher sehr problematischen Ausgangsproben, z. B. bei Vollblut, das mit Citrat und EDTA oder der PCR inhibierenden Substanz Heparin behandelt wurde, sowie bei Stuhlproben, die aus der Lyse von im Stuhl abgeschilften Darmepithelzellen stammen und einen hohen Anteil an nicht bekannten Inhibitoren aufweisen.

Bei biologischen Ausgangsproben, bei denen die zu isolierende Nukleinsäure intrazellulär vorliegt, wie beispielsweise abgeschilfte Darmepithelzellen enthaltende Stuhlproben, sind die Zellen zunächst zu lysieren, um das intrazelluläre Material aufzuschließen.

Die Lyse bzw. der Aufschluß der Zellen kann durch eine gleichzeitige physikalische und chemische Einwirkung auf die körperrzellenhaltige Probe erzielt werden. Das Probenmaterial kann vor der Lyse in tiefgefrorenem Zustand (-80°C) vorliegen. Im Lysepuffer ist geeigneterweise ein denaturierendes Agens, z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS) oder andere Detergentien enthalten, welches den chemischen Aufschluß der Zellen bewirkt, während das Verrühren der Suspension, beispielsweise mit einem automatischen, mechanischen Rührsystem, den mechanischen Aufschluß begünstigt. Bei Stuhlproben hat sich gezeigt, daß bei sehr fester Konsistenz ein kräftiges Durchmischen der Probe mit einem Reagenzglasschüttler die Folgeanwendungen erleichtert. Durch einen Zentrifugationsschritt können Zelltrümmer, unverdaute Nahrungsmittelreste oder andere Makrorreste entfernt werden.

Anschließend an die Lyse erfolgt die Behandlung des Nukleinsäure-haltigen Zellsats mit dem erfindungsgemäß eingesetzten, speziellen Anionenaustauscher-Harz. Es empfiehlt sich, das Harz in einem geeigneten Puffer, beispielsweise dem Lysepuffer, vorzuquellen, um Verluste des Volumens der wäßrigen Nukleinsäure-Lösung zu vermeiden.

Es hat sich gezeigt, daß eine wäßrige, bis 10 gewichts-%ige, insbesondere 5 bis 10 gewichts-%ige Harzsuspension des Copolymeren die Inhibitoren in ausreichender Menge bindet und gleichzeitig die Konzentration der in der wäßrigen Lösung vorliegenden DNA nicht oder nur unwesentlich herabsetzt.

Geeigneterweise steht dabei die eingesetzte Menge an Copolymer-Harz zu der Häufigkeit der Umsetzung in einem umgekehrten Verhältnis. Das heißt, bei einem relativ hohen Gehalt, insbesondere bei 7,5 bis 10 Gew.-% Harzsuspension in wäßrigem Medium, ist eine einmalige Umsetzung vorzuziehen, während im mittleren Gehaltsbereich, etwa von 2,5 bis 7,5 Gew.-% und insbesondere um 5 Gew.-% (± 1 Gew.-%), eine zwei- oder mehrmalige Umsetzung bessere Resultate liefert. Das vorzugsweise zu wählende Verhältnis von Harzgehalt zu Häufigkeit der Umsetzung hängt aber auch von dem jeweils zu untersuchenden Probenmaterial ab. So ist bei Stuhlproben ein einmaliges Umsetzen mit 10 Gew.-% oder ein zweimaliges Umsetzen mit jeweils 5 Gew.-% Copolymer-Harz gut geeignet. Bei Vollblut sind Gehaltsbereiche unter 5 Gew.-% vorzuziehen, wobei ein zweimaliges

DE 197 31 670 A 1

5

Umsetzen mit jeweils 2,5 Gew.-% Copolymer-Harz besonders gut geeignet ist.

Beim Umsetzen wird am einfachsten die Nukleinsäurehaltige (ggf. nicht vorgereinigte) Probe mit der Harz-Suspension versetzt, sehr gut gemischt, und dann wieder vom Copolymeren-Harz abgetrennt. Letzteres kann bequem durch ein Abzentrifugieren des Harzgranulats erfolgen.

Es hat sich herausgestellt, daß eine zu häufige Wiederholung der Extraktion, insbesondere bei hohem Mengeneinsatz von über 10 Gew.-%, zu einer nachteiligen Reduzierung der Nukleinsäure-Menge führt. Die Ursache hierfür bleibt ungeklärt. Es wird vermutet, daß das spezielle Copolymere zunächst die Inhibitoren bindet und dadurch abgesättigt wird. Fehlen jedoch die Inhibitoren in der wäßrigen Lösung, kann das spezielle Copolymere aufgrund seiner Ladungseigenschaften verstärkt die Nukleinsäure binden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird eine ausreichende Abreinigung von Inhibitoren für gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Nachweisreaktionen unter gleichzeitigem Erhalt einer genügend hohen Nukleinsäure (DNA)-Konzentration sichergestellt.

Anschließend an die Inhibitorabreinigung kann die DNA weiter isoliert werden. Vorteilhaft ist es, hierfür zunächst unspezifisch wirkende Proteinase wie die Proteinase K einzusetzen, um Proteine und Nukleinsäure-spaltende Enzyme abzubauen. Danach erhält man eine viskose, gallertartige Flüssigkeit. Daraus wird die DNA vorzugsweise mittels Phenolextraktion und anschließender Ethanolpräzipitation aus der wäßrigen Phase isoliert. Alternativ läßt sich die DNA durch die Verwendung eines Detergens, beispielsweise eines chaotropen, Guanidin-haltigen Detergens (wie DNAzol™ von Gibco BRL), mit anschließender Ethanolfällung aus der wäßrigen Phase isolieren. Dazu wird die DNA-haltige, mit Proteinase K verdaut Lösung mit dem Detergens und Ethanol versetzt und sofort durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert. Da weder organische Lösungsmittel (Phenol, Chloroform) eingesetzt werden, noch mehrere Zentrifugationsschritte zur Extraktion nötig sind, ist dieses Verfahren sehr anwenderfreundlich und zeitsparend. Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie Phenol oder chaotropen Detergentien zur Isolierung von DNA kann alternativ durch den Gebrauch von für diesen Zweck bekannten Zentrifugationssäulen ersetzt werden, beispielsweise durch QIAamp-spin columns™ von Qiagen™. Hierbei eignet sich zur Zellyse sowohl ein Proteinase K-Verdau, sowie die Verwendung von kommerziell erhältlichen Lysepuffern (z. B. AVL-Puffer des QIAamp Viral RNA Kits™ von Qiagen, Hepatitis C Virus-Lysereagenz des Amplicor HCV Kits™ der Hoffmann-La Roche AG). Bei der Verwendung der käuflichen Lysepuffer erfolgt die Behandlung der Proben analog dem jeweiligen Protokoll der Hersteller.

An die Reinigung bzw. Isolierung der DNA bzw. RNA können sich dann – je nach Wunsch – Folgereaktionen anschließen. Die hierfür erforderliche Qualität der Nukleinsäureprobe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Verfügung gestellt. Die erfindungsgemäße Verfahrensweise gewährleistet eine Präparation der Nukleinsäure mit hoher Ausbeute (beispielsweise 10–15 µg DNA pro 200 mg Stuhlprobe) und Reinheit ($A_{260/280} = 1,7$) unter Abreinigung von Inhibitoren enzymatischer Reaktionen und erlaubt es, eine qualitativ reproduzierbare Analytik durchzuführen, insbesondere in Kombination mit enzymatischen Verfahren zur Amplifikation von DNA.

Es hat sich herausgestellt, daß das erfindungsgemäße Verfahren in besonders günstiger Weise mit einer PCR-Amplifikation kombiniert werden kann, wobei bereits eine einfache PCR in 87% aller untersuchten Stuhlproben zum Erfolg führte.

6

Die gemäß dem erfindungsgemäßen Reinigungsverfahren gereinigte bzw. isolierte DNA wird vorzugsweise einer PCR unterworfen, die in Gegenwart eines Trägerproteins, wie Rinderserumalbumin (BSA), ausgeführt wird. Die Trägerproteinkonzentration wird dabei hoch gewählt, vorzugsweise mehr als 50 µg/ml. Sehr gute Amplifikationsraten haben sich bei Trägerprotein Konzentrationen im Bereich von 120–200 µg/ml ergeben. Weiterhin wirken sich relativ hohe Konzentrationen an für die PCR erforderlichen Nukleotiden (Desoxyribonukleosid-Triphosphate), Primer und DNA-Polymerasen wie der Tag-DNA-Polymerase vorteilhaft aus. Die Nukleotidkonzentrationen liegen vorzugsweise im Bereich von 150–225 µM. Gleichzeitig liegt die Primerkonzentration im Bereich von 0,75 bis 1,25 µM. Der Gehalt an DNA-Polymerase liegt geeigneterweise im Bereich von 2,5 bis 3 Units pro 50 µl-Ansatz.

Die Amplifikation erfolgt hinsichtlich der beabsichtigten routinemäßigen Anwendung im diagnostischen Labor vorzugsweise durch eine einfache PCR, in der 30–35 Temperaturzyklen durchlaufen werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Isolierung von DNA aus einer Stuhlprobe

200 mg Stuhlmaterial wird für die Dauer von mindestens einer Stunde bei -80°C tiefgefroren, anschließend mit 600 µl Lysepuffer (500 mM Tris, 75 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS, pH 9,0) versetzt und homogenisiert. Die lytierte Probe wird 10 min. bei 4°C und $6000 \times g$ in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, um grobe Stuhlpartikel, Zelltrümmer, Bakterien und Nahrungsmittelreste abzutrennen. Der Überstand wird ein zweites Mal bei 4°C , $20\,000 \times g$ 10 min. zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wird mit dem gleichen Volumen einer Colestyramin-Lösung (5% Colestyramin in Lysepuffer) versetzt, gut durchmischt, 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben bei $20\,000 \times g$ zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Extraktionsschrittes wird der klare Überstand mit der Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) 2 Stunden bei 56°C inkubiert. Die verdaut Probe wird mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt, gut durchmischt und 5 min. bei Raumtemperatur und $20\,000 \times g$ abzentrifugiert. Die wäßrige, obere Phase wird ein weiteres Mal mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Aus der wäßrigen, oberen Phase kann die DNA durch eine Ethanolpräzipitation, durch Zugabe von 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen 100%igem Ethanol, pelletiert werden. Das in 75%igem Ethanol gewaschene und bei Raumtemperatur getrocknete DNA-Pellet wird in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. Die DNA-Ausbeute beträgt 10–15 µg pro 200 mg Stuhlprobe mit einem $A_{260/280}$ -Verhältnis von 1,7. 5 µl dieser DNA-Lösung werden zur Amplifikation definierter Gene/Genabschnitte in einem 50 µl-PCR-Ansatz eingesetzt. Das Amplifikationsgemisch setzt sich wie folgt zusammen:

- 10 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 50 mM KCl
- 2,0 mM MgCl_2
- 200 µM jedes dNTP
- 160 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)
- 1 µM jeder Primer
- 2,5 U Tag-DNA-Polymerase pro 50 µl-Ansatz

DE 197 31 670 A 1

7

Beispiel 2

Isolierung von DNA aus Vollblut

500 µl Citrat-, Heparin- oder EDTA-Blut oder tiefgefrorenes und wieder aufgetautes Blut werden mit 500 µl Lysepuffer (500 mM Tris, 75 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS, pH 9,0) versetzt und gut durchmischt. Die DNA-haltige Lösung wird mit dem gleichen Volumen einer Colestyramin-Lösung (2,5% Colestyramin in Lysepuffer) versetzt, gut durchmischt, 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben bei 20 000 × g zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Extraktionsschnittes wird der klare Überstand mit der Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) 2 Stunden bei 56°C inkubiert. Die verdauten Probe wird mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, gut durchmischt und 5 min. bei Raumtemperatur und 20 000 × g abzentrifugiert. Die wäßrige, obere Phase wird ein weiteres Mal mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24 : 1) versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach effizienter Lyse aller eukaryontischen und/oder prokaryontischen Zellen und/oder Viren (gleichzeitige Inaktivierung infektiöser Pathogene) und durch Denaturierung und enzymatischen Abbau von Proteinen (gleichzeitige Entfernung der an die Nukleinsäure gebundenen Proteine) kann die DNA aus der wäßrigen, oberen Phase durch eine Ethanolpräzipitation, durch Zugabe von 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen 100%igem Ethanol, pelletiert werden. Das in 75%igem Ethanol gewaschene und bei Raumtemperatur getrocknete DNA-Pellet wird in 30 µl destilliertem Wasser gelöst. Die DNA-Ausbeute beträgt 5–10 µg pro 500 µl Vollblut mit einem A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis von 1,7. 5 µl dieser DNA-Lösung werden zur Amplifikation definierter Gene/Genabschnitte in einem 50 µl-PCR-Ansatz eingesetzt. Das Amplifikationsgemisch setzt sich wie folgt zusammen:

10 mM Tris-HCl, pH 8,3
 50 mM KCl
 2,0 mM MgCl₂
 200 µM jedes dNTP
 160 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)
 1 µM jeder Primer
 2,5 U Taq-DNA-Polymerase pro 50 µl-Ansatz

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung, gegebenenfalls auch Analyse, von Nukleinsäuren aus biologischen Proben, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren den Schritt umfaßt, daß die Nukleinsäurehaltige Probe zur Abtrennung von Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Analysereaktion mit einem mit quartären Ammoniumgruppen modifizierten Copolymeren aus Vinyl- und Divinyl-Monomeren umgesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Umsetzung der Gehalt des Copolymeren in einer Copolymer Suspension 10 Gew.-% nicht übersteigt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Copolymer aus aromatischen Vinyl- und Divinyl-Monomeren gebildet ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die aromatischen Vinyl- und Divinyl-Monomeren Vinylbenzol und Divinylbenzol sind.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Copolymer Colestyramin verwendet wird.

8

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure nach der Umsetzung mit dem Copolymeren durch Phenolextraktion mit anschließender Alkoholpräzipitation isoliert wird.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierte Nukleinsäure zur nachfolgenden Analyse einer Polymerase-Kettenreaktion unterworfen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerase-Kettenreaktion in Gegenwart von Trägerprotein erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerprotein-Konzentration mehr als 50 µg/ml beträgt.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß in der Polymerase-Kettenreaktion folgende Konzentrationen eingesetzt werden:
 Trägerproteinkonzentration: 120–200 µg/ml,
 Konzentration jedes Desoxyribonukleosid-Triphosphats: 175–225 µM, und
 Konzentration jedes Primers: 0,75–1,25 µM.

- Leerseite -

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.